



PCT WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro
INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

<p>(51) Internationale Patentklassifikation 7 : C07K 7/02, 14/025, A61K 38/10, C07K 14/47</p>	<p>A1</p>	<p>(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 00/42064 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 20. Juli 2000 (20.07.00)</p>
<p>(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE00/00141 (22) Internationales Anmeldedatum: 12. Januar 2000 (12.01.00) (30) Prioritätsdaten: 199 01 008.0 13. Januar 1999 (13.01.99) DE (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): DEUTSCHES KREBSFORSCHUNGSZENTRUM STIFTUNG DES ÖFFENTLICHEN RECHTS [DE/DE]; Im Neuenheimer Feld 280, D-69120 Heidelberg (DE). (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): BUTZ, Karin [DE/DE]; Weinheimer Strasse 7, D-69493 Hirschberg (DE). HOPPE-SEYLER, Felix [DE/DE]; Hirtenaue 38, D-69118 Heidelberg (DE). (74) Anwalt: HUBER, Bernard; Huber & Schüssler, Truderinger Strasse 246, D-81825 München (DE).</p>		<p>(81) Bestimmungsstaaten: JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist; Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i></p>
<p>(54) Title: PEPTIDES FOR INHIBITING HPV E6 PROTEINS (54) Bezeichnung: PEPTIDE ZUR INHIBIERUNG VON HPV E6-PROTEINEN (57) Abstract The invention relates to peptides which are suitable for inhibiting HPV E6 proteins, to DNAs coding them and to the use of both, especially for eliminating HPV tumour cells. (57) Zusammenfassung Die vorliegende Erfindung betrifft Peptide, die sich zur Inhibierung von HPV E6-Proteinen eignen, sie kodierende DNAs und die Verwendung beider, insbesondere zur Eliminierung von HPV-Tumorzellen.</p> <p style="text-align: center;">BEST AVAILABLE COPY</p>		

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidshan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

Peptide zur Inhibierung von HPV E6-Proteinen

Die vorliegende Erfindung betrifft Peptide, die sich zur Inhibierung von HPV E6-Proteinen eignen, sie kodierende DNAs und die Verwendung beider, insbesondere zur Eliminierung von HPV positiven Zellen, z.B. HPV-Tumorzellen.

Humane Papillomviren (HPVs) sind eng mit der Entwicklung von Karzinomen verbunden. Gut charakterisiert ist die Beteiligung von HPVs an der Entstehung des Zervixkarzinoms und verschiedene Befunde weisen darauf hin, daß HPVs eine kausale Rolle in der Ätiologie dieses Karzinoms spielen. Auf der molekularen Ebene sind in etwa 95 % der Zervixkarzinom-Biopsien Sequenzen von HPVs, insbesondere HPV 16 und 18, nachweisbar. Die HPV-DNA liegt dabei meist integriert im Genom der Tumorzellen vor. Sie weist häufig Deletionen und/oder Rearrangements auf, wobei sich diese nie auf die frühen HPV-Gene, nämlich die E6- und E7-Gene, beziehen. Diese Gene kodieren für die HPV-Proteine E6 und E7, die für die Entstehung und Manifestierung von HPV-Karzinomen verantwortlich sind. Die HPV-Proteine wirken dabei synergistisch. Andererseits gibt es Hinweise, daß sie auch entgegengesetzte Aktivitäten aufweisen. Beispielsweise induziert das E7-Protein Apoptose, während das E6-Protein eine solche inhibiert. Dies erfolgt dadurch, daß das E6-Protein direkt oder indirekt, d.h. über Ubiquitin-Protein-Ligase E6-AP, an p53 bindet und dieses hemmt, wodurch p53 seine Apoptose-induzierende Aktivität nicht mehr entfalten kann. Desweiteren besitzt das E6-Protein auch eine p53 unabhängige anti-apoptotische Aktivität. Die Gene der E6- und E7-Proteine werden über polycistronische mRNAs exprimiert, wobei die Transkription unter der Kontrolle eines gemeinsamen Promotors steht. Es sind Versuche bekannt, letzteren bzw. E6-/E7 mRNAs zu inhibieren. Diese Versuche führten zu einer partiellen Inhibierung des Wachstums von HPV-

Tumorzellen. Eine Eliminierung solcher Zellen, was sehr erwünscht ist, konnte damit aber nicht erreicht werden.

5 Der vorliegenden Erfindung liegt somit die Aufgabe zugrunde, ein Mittel bereitzustellen, mit dem HPV-Tumorzellen, eliminiert werden können.

10 Erfindungsgemäß wird dies durch die Gegenstände in den Patentansprüchen erreicht.

15 Der Anmelder hat erkannt, daß HPV E6-Proteine an kurze Peptide binden. Er hat eine randomisierte Oligopeptid-Bibliothek, die zufallsgenerierte Peptid-Sequenzen umfaßt, mit einem "Peptid-Aptamer-System" gescreent, in dem das HPV-E6-Protein als Screening-Probe verwendet wurde. Hierbei hat er gefunden, daß kurze Peptide, insbesondere die in Tabelle 1 aufgeführten, HPV E6-Proteine binden. Ferner hat er erkannt, daß sich diese Peptide eignen, Aktivitäten von HPV E6-Proteinen, z.B. ihre anti-apoptotische Aktivität, zu inhibieren. Des weiteren hat er erkannt, daß durch diese Inhibierung eine Eliminierung von HPV-positiven Zellen, insbesondere HPV-Tumorzellen, erreicht werden kann.

25 Erfindungsgemäß werden die Erkenntnisse des Anmelders genutzt, ein Peptid bereitzustellen, das aus den in Tabelle 1 aufgelisteten Peptiden ausgewählt ist, wobei das Peptid eine Modifikation in der Sequenz von bis zu 40 %, insbesondere 20 % und ganz besonders 10 %, aufweisen kann.

30

Tabelle 1

35	E61-1.pep:	NH ₂ -GALVHKLFSQ TSGSCLVCIS-COOH
	E61-2.pep:	NH ₂ -LDVLGCLVRR LGVVLVGLH-COOH
	E61-3.pep:	NH ₂ -CYVECGCEVL TALVNGVRVL-COOH
	E61-5.pep:	NH ₂ -GVGGLCSCAS CVSEDFYASV-COOH
	E61-7.pep:	NH ₂ -IDLLRRLSQ LHLLVSVGG-COOH
	E61-8.pep:	NH ₂ -LAVLLNGYTRAIVGISFGGW-COOH
	E61-9c.pep:	NH ₂ -LCTMCATVFR PLLVFWFSIW-COOH

	E61-10.pep:	NH ₂ -QLLLDLLLGS YEGMSLTSSP-COOH
	E61-11.pep:	NH ₂ -SRSNALHTLD VLLGGT-COOH
	E61-12.pep:	NH ₂ -GGAVYLCDAG CCFYCCGCSG-COOH
	E61-13.pep:	NH ₂ -CLELFDDLFL ALSLLLLVGG-COOH
5	E61-14.pep:	NH ₂ -PLCRTCLIES AVLIQLSRL-COOH
	E61-15.pep:	NH ₂ -VFSGVYAEF VFAASAGGTP-COOH
	E61-16.pep:	NH ₂ -MAPVGAGRPC CTVCFLTARF-COOH
	E61-17.pep:	NH ₂ -LSMLLFAAKL PVAVLCSWQA-COOH
	E61-19.pep:	NH ₂ -LVGRVRIGVS VFIRGGRLI-COOH
10	E61-20.pep:	NH ₂ -LFDIFRLCAQPVLVHGHTRV-COOH

Erfindungsgemäße Peptide eignen sich HPV E6-Proteine zu binden und in ihren Aktivitäten, z.B. in ihrer anti-apoptotischen Aktivität, zu inhibieren.

15

Der Ausdruck "HPV E6-Proteine" umfaßt ein E6-Protein jeglichen HPV-Typs, insbesondere von HPV1, 5, 6, 11, 16, 18, 31, 33 oder 35. Ein E6-Protein kann eine Wildtyp-Sequenz oder eine hiervon durch ein oder mehrere Aminosäuren unterschiedliche Sequenz aufweisen. Ferner kann es in verkürzter Form vorliegen, d.h. es liegt nur in Form jenes Fragments vor, das für die Bindung an p53, Ubiquitin-Protein-Ligase E6-AP oder einen anderen Bindungspartner des E6-Proteins notwendig ist. Das Fragment kann auch in Mehrfachkopien innerhalb eines Polypeptid-Moleküls vorliegen. Des weiteren kann ein E6-Protein bzw. ein Fragment davon in Form eines Fusionsproteins vorliegen.

20

25

Erfindungsgemäße Peptide können durch übliche Verfahren, in denen Peptide hinsichtlich ihrer Bindung an HPV E6-Proteine getestet werden, bereitgestellt werden. Solche Verfahren sind z.B. das "Peptid-Aptamer-" oder "Bakteriophagen-Display"-Verfahren. Günstig ist es, das in den Beispielen beschriebene "Peptid-Aptamer"-Verfahren zu verwenden, das eine Modifizierung des vorstehend erwähnten Verfahrens ist.

30

35

Erfindungsgemäße Peptide können als solche oder in Verbindung mit anderen Stoffen, z.B. (Poly)peptiden, vorliegen. Die Verbindung kann darin bestehen, daß die erfindungsgemäßen

Peptide über Linker, z.B. Disulfidbrücken, mit den (Poly)peptiden verbunden sind. Auch können die erfindungsgemäßen Peptide mit den (Poly)peptiden fusioniert sein, wodurch die erfindungsgemäßen Peptide in Form von Fusions(poly)peptiden vorliegen. Als (Poly)peptide für Fusions(poly)peptide bieten sich z.B. "Leader"-Peptide, wie Penetratin von Drosophila Antennapedia oder VP22 von HSV1 an, welche die Aufnahme der erfindungsgemäßen Peptide in Zellen fördern. Andererseits können Polypeptide, die über Linker mit dem erfindungsgemäßen Peptid verbunden sind, z.B. Trägerproteine, wie Transferrin sein, die im Körper als nicht fremd angesehen werden. Auch können mehrere erfindungsgemäße Peptide gleichzeitig in Verbindung mit einem vorstehenden Stoff vorliegen.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist eine Nukleinsäure, insbesondere eine DNA, die für ein erfindungsgemäßes Peptid kodiert. Eine solche DNA kann in Vektoren, insbesondere Expressionsvektoren vorliegen. Beispiele solcher sind dem Fachmann bekannt. Im Falle eines Expressionsvektors für E. coli sind dies z.B. pGEMEX, pUC-Derivate, pGEX-2T, pET3b oder pQE-8. Für die Expression in Hefe sind z.B. pY100 oder Ycpad1 zu nennen, während für die Expression in tierischen Zellen z.B. pKCR, pEFBOS, cDM8 oder pCEV4 anzugeben sind. Für die Expression in Insektenzellen eignet sich besonders der Bacculovirus-Expressionsvektor pAcSGHisNT-A. Ferner können für die Expression in tierischen Zellen Viren, z.B. Adenovirus, Vaccinia-Virus, Adeno-assoziiertes Virus (AAV) oder Retroviren, wie MoMuLV, HaMuSV, MuMTV, RSV oder GaIV), verwendet werden.

Der Fachmann kennt geeignete Zellen, um die erfindungsgemäße, in einem Expressionsvektor vorliegende DNA zu exprimieren. Beispiele solcher Zellen umfassen die E.coli-Stämme HB101, DH1, x1776, JM101, JM109, BL21 und SG 13009, den Hefe-Stamm Saccharomyces cerevisiae und die tierischen Zellen L, NIH 3T3, FM3A, CHO, COS, Vero und HeLa sowie die Insektenzellen sf9.

Der Fachmann weiß, in welcher Weise die erfindungsgemäße DNA

in einen Expressionsvektor inseriert werden muß. Ihm ist auch bekannt, daß diese DNA in Verbindung mit einer für ein anderes Peptid bzw. Polypeptid kodierenden DNA inseriert werden kann, so daß die erfindungsgemäße DNA in Form eines Fusionspolypeptids exprimiert werden kann.

Des weiteren kennt der Fachmann Bedingungen, transformierte bzw. transfizierte Zellen zu kultivieren. Auch sind ihm Verfahren bekannt, das durch die erfindungsgemäße DNA exprimierte Peptid bzw. Fusionspolypeptid zu isolieren und zu reinigen.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein gegen ein vorstehendes Peptid bzw. Fusionspolypeptid gerichteter Antikörper. Ein solcher Antikörper kann durch übliche Verfahren hergestellt werden. Er kann polyklonal bzw. monoklonal sein. Zu seiner Herstellung ist es günstig, Tiere, insbesondere Kaninchen oder Hühner für einen polyklonalen und Mäuse für einen monoklonalen Antikörper, mit einem vorstehenden (Fusions)polypeptid oder Fragmenten davon zu immunisieren. Weitere "Booster" der Tiere können mit dem gleichen (Fusions)polypeptid oder Fragmenten davon erfolgen. Der polyklonale Antikörper kann dann aus dem Serum bzw. Ei der Tiere erhalten werden. Für den monoklonalen Antikörper werden Milzzellen der Tiere isoliert und mit Myelomzellen fusioniert.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist eine pharmazeutische Zusammensetzung, die ein oder mehrere der erfindungsgemäßen Peptide und/oder sie kodierende DNAs sowie übliche Hilfsstoffe enthält. Als Hilfsstoffe können z.B. Arzneimittelträger, Bindemittel, Sprengmittel, Gleitmittel, Lösungsmittel, Lösungsmittelvermittler, Freigabe-Beschleuniger, Freigabe-Verzögerer, Emulgatoren, Stabilisatoren, etc. verwendet werden. Eine solche Zusammensetzung kann in üblicher Weise, z.B. oral oder parenteral, verwendet werden. Die geeignete Dosierung wird für den Einzelfall in üblicher Weise bestimmt.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist eine diagnostische Zusammensetzung, die ein oder mehrere erfindungsgemäße Peptide enthält. Mit einer solchen Zusammensetzung können HPV E6-Proteine nachgewiesen werden.

- 5 Dies kann genutzt werden, um HPV-assoziierte Erkrankungen, wie HPV-Infektionen, HPV-Dysplasien oder HPV-Karzinome, nachzuweisen. Ein solcher Nachweis beinhaltet beispielsweise (a) Gewinnung einer Zellprobe von einem Patienten, (b) Inkontaktbringung der Zellprobe mit einem erfindungsgemäßen Peptid unter Bedingungen, welche die spezifische Bindung des
- 10 Peptids an ein HPV E6-Protein erlauben, und (c) Nachweis des Peptids. Dieser Nachweis kann durch Standardverfahren erfolgen. Beispielsweise können die erfindungsgemäßen Peptide in Flüssigphase vorliegen oder an einen festen Träger gebunden
- 15 werden und auf verschiedene Art und Weise markiert sein. Geeignete Marker und Markierungsverfahren sind dem Fachmann bekannt. Auch können die Peptide durch erfindungsgemäße Antikörper nachgewiesen werden. Letztere eignen sich ferner dazu, den Therapieverlauf einer mit erfindungsgemäßen Peptiden
- 20 behandelten HPV-assoziierten Erkrankung zu kontrollieren.

- Mit der vorliegenden Erfindung ist es möglich HPV E6-Proteine zu binden und in ihren Aktivitäten, insbesondere in ihrer anti-apoptotischen Aktivität, zu inhibieren. Damit kann die
- 25 Eliminierung von HPV-positiven Zellen, insbesondere HPV-Tumorzellen, erreicht werden. Ferner können HPV-positive Zellen diagnostiziert werden. Damit eignet sich die vorliegende Erfindung gegen HPV-assoziierte Erkrankungen, insbesondere HPV-Infektionen, HPV-Dysplasien oder HPV-Karzinome, diagnostisch und therapeutisch vorzugehen. Des weiteren
- 30 stellen die erfindungsgemäßen Peptide bzw. sie kodierende DNAs eine Basis dar, völlig neue Wirkstoffe gegen vorstehende Erkrankungen zu entwickeln.

Kurze Beschreibung der Zeichnungen.

Fig. 1 zeigt schematisch das modifizierte "Peptid-Aptamer"-System in *S. cerevisiae*. Dieses System umfaßt drei Komponenten: (1) das Zielprotein (E6), das mit einer heterologen DNA-Bindungsdomäne (GAL4BD) fusioniert ist, (2) ein Peptid mit randomisierter Aminosäuresequenz, das an eine transkriptionelle Aktivierungsdomäne (GAL4AD) fusioniert ist und (3) ein stabil integriertes Selektionsgen (prototrophe Selektionsmarker, wie ADE2), das in seinem Promotor die Erkennungssequenz für die DNA-Bindungsdomäne besitzt. Durch Interaktion zwischen dem Peptid und dem Zielprotein entsteht ein synthetischer Transkriptionsfaktor, der durch die Transaktivierungsdomäne an die Erkennungssequenz im Promotorbereich des Selektionsgens bindet und durch die Transaktivierungsdomäne die Transkription des Selektionsgens stimuliert. Unter Selektionsbedingungen (z.B. Adenin-negativen Nährböden) bilden nur jene Hefezellen Kolonien, die ein Peptid mit Affinität für das Zielprotein exprimieren (TrxA = *E. coli* Thioredoxin A; TAG = Influenza Virus HA-Tag; NLS = nukleäres Lokalisationssignal).

Fig. 2 zeigt die Analyse von HPV16 E6-bindenden Peptiden im "Peptid-Aptamer"-System. Durch Screening von etwa 2×10^6 Hefezellen werden 15 positive Klone isoliert (vgl. Tabelle 1, E61-1.pept - E61.-17.pap). Es werden Replika-Plattierungen der Hefekolonien (Masterplatte oben: 1-15 = positive Klone; K = zufällig ausgewählter Kontroll-Klon) unter Selektion auf ADE2 (GAL4-BS im Kontext des GAL2-Promotors), HIS3 (GAL4BS im Rahmen des GAL1-Promotors) und URA3 (GAL4-BS im Rahmen des SPO13-Promotors) durchgeführt.

Die folgenden Beispiele erläutern die Erfindung.

Beispiel 1: Screening nach HPV E6-Protein bindenden Peptiden

5 Es wird ein Verfahren verwendet, das sich von dem bekannten "Peptid-Aptamer"-System ableitet. Das Verfahren ist in Fig. 1 schematisch dargestellt.

Für das Screening nach HPV E6-Protein bindenden Peptiden wird eine randomisierte Oligopeptid-Expressionsbank für 20
10 Aminosäuren-lange Peptide mit zufälliger Sequenz hergestellt (Komplexität ca. 2×10^8 unterschiedliche Peptide). Kodons werden durch die Sequenz NNK definiert (N = G, A, T oder C; K = G oder C). Sie kodieren für alle 20 Aminosäuren, resultieren aber nur in einem Stop-Kodon. Als Expressionsvektor wird ein
15 Hefe-Expressionsvektor, pADTrx, verwendet. Dieser enthält E.coli Trx A (Thioredoxin-Protein) aus pTrx (Invitrogen) und GAL4AD sowie den ADH-Promotor aus pAS2 bzw. pGAD424 (Clontech). Die Peptide werden im Rahmen der aktiven Schleife von Trx exprimiert. Dies hat folgende Vorteile:

- 20
- im Rahmen der Trx-Schleife ist die Präsentation der Peptide nach außen gewährleistet,
 - konformell restringierte Peptide können Aminosäuren nach außen exponieren, die bei flexiblen Peptiden im
25 intrazellulären Milieu möglicherweise nach innen gefaltet werden,
 - konformell restringierte Peptide können hochaffine Peptide sein, die das Potential besitzen, auch in vivo als effiziente Proteininhibitoren zu wirken.

30 Ferner wird ein Hefestamm, KF-1, verwendet. Dieser stammt von dem Hefe-

stamm PJ69-4A (vgl. James et al., Genetics 144 (1996), 1425) und erlaubt die Analyse von drei Selektionsmarkern: ADE2, HIS3
35 und URA3. Jeder der drei Selektionsmarker steht unter der transkriptionellen Kontrolle von GAL4-Bindungsstellen im Rahmen unterschiedlicher Promotoren. Der Selektionsmarker URA3 wird durch den SP013-Promotor reguliert, der aus dem Hefestamm

MaV103 (vgl. Vidal, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (93), 10315-10320) stammt, ein negativ-regulatorisches Element enthält und durch starke Protein-Protein-Interaktionen aktiviert werden kann. Ferner enthält der Hefestamm das E.coli β -Galaktosidase-(-Gal)-Gen als weiteren Marker, dessen Aktivität leicht quantifizierbar ist und eine Abschätzung der in vivo Bindungsaffinität des Peptids an das E6-Protein ermöglicht. Auch die Aktivierung des HIS3-Gen kann durch Titration mit 3'AT-(3-Amino- -1, 2, 4-Triazol) quantifiziert werden.

Das HPV16 E6-Protein wird einem Screening mit vorstehendem System unterzogen. Hierzu wird es in Form eines es kodierenden Expressionsvektors bereitgestellt. Als Basisvektor dient pPC97 (vgl. Vidal et al. vorstehend), in dem die kodierende Sequenz eines HPV 16 E6-Proteins inseriert ist. Aus ca. 2×10^6 Hefeklonen werden 15 Klone isoliert, die unter Selektion mit ADE2 ein Wachstum zeigen. Replika-Plattierungen und die Analyse der drei Selektionsmarker zeigen, daß 14 der 15 Klone auch unter Selektion mit HIS3 Wachstum zeigen (Fig. 2). Desweiteren zeigen 6 der isolierten Klone zusätzlich Wachstum unter URA3-Selektion, was unter den hier eingesetzten Bedingungen auf eine besonders hohe in vivo Affinität des entsprechenden Peptids für das HPV E6-Protein hinweist.

Zur weiteren Kontrolle werden aus den 15 Klonen die entsprechenden Peptid-Expressionsplasmide isoliert und nach erneuter Transformation in Hefe einem Rescreening unterzogen. Das Rescreening zeigt eine komplette Übereinstimmung mit den Ergebnissen aus den vorstehenden Replika-Plattierungen (Fig. 2). Es zeigt sich, daß das Wachstum der Hefe von der Bindung der Peptide an das HPV16 E6-Protein abhängt.

Die Peptide der 15 Klone werden in ihrer Aminosäuresequenz bestimmt. Diese ist in Tabelle 1, E61-1.pep - E61-17.pep angegeben. Ein Teil der Peptide zeigt Sequenzhomologien zu den untereinander verwandten Bindungsdomänen der E6-bindenden Proteine E6-AP, E6-BP und Paxillin ("LhXΦLs-" ähnliche Motive,

wobei: h = Q, E oder N; X = jede beliebige Aminosäure; Φ = hydrophobe Aminosäure; s = kleine Aminosäure wie G oder A und - = saure Aminosäure. Der andere Teil der E6-bindenden Peptide weist keine offensichtlichen Sequenz-Ähnlichkeiten zu den vorstehenden E6-bindenden Proteinen auf. Ihre Sequenzen können jedoch Hinweise auf bislang unbekannte E6-Interaktionspartner geben.

In einem weiteren Screening-Ansatz werden zwei weitere Klone erhalten. Ihre Aminosäuresequenz ist in Tabelle 1, E61-19.pep und E61-20.pep angegeben.

Beispiel 2: Inhibierung der anti-apoptotischen Aktivität von HPV E6-Proteinen durch erfindungsgemäße Peptide.

Es wird das "VP 22-Shuttle-System" verwendet. Dieses beruht darauf, daß das HSV1-VP 22-Protein von Zellen aufgenommen wird, d.h. als Träger verwendet werden kann. Es werden Fusionspolypeptide aus VP 22 und erfindungsgemäßen Peptiden von Tabelle 1 hergestellt. Hierzu wird der Expressionsvektor pCEP4 (Invitrogen) verwendet. In diesen werden die DNA-Sequenzen der vorstehenden Peptide in Phase mit der DNA-Sequenz von VP 22 inseriert. Die Peptide werden dabei im Rahmen des E. Coli TrxA-Proteins exprimiert. Die erhaltenen Expressionsplasmide pCEP4/E61-1.pep bzw. pCEP4/E61-2.pep werden in HPV16 positive SiHa bzw. CaSKi-Zervixkarzinom-Zellen transfiziert. Zu verschiedenen Zeitpunkten wird die Morphologie der Zellen und ihr Wachstum durch übliche Verfahren untersucht.

Es zeigt sich, daß durch die erfindungsgemäßen Peptide die anti-apoptotische Aktivität von HPV E6-Proteinen inhibiert werden kann. Ferner zeigt sich, daß die durch HPV E7-Proteine induzierte Apoptose erhalten wird. Dies spiegelt sich auch in "Colony-Formation-Assays" wieder, die eine starke Wachstumsinhibition der Zellen zeigen. Somit eignet sich ein erfindungsgemäßes Peptid HPV-positive Zellen, insbesondere

HPV-Tumorzellen, zu eliminieren.

Patentansprüche

1. Peptid, ausgewählt aus den folgenden Peptiden

5

NH₂-GALVHKLFSQ TSGSCLVCIS-COOHNH₂-LDVLGCLVRR LGVVLVGLH-COOHNH₂-CYVECGCEVL TALVNGVRVL-COOHNH₂-GVGGLCSCAS CVSEDFYASV-COOH

10

NH₂-IDLLRRLGSQ LHLLLVSVGG-COOHNH₂-LAVLLNGYTRAIVGISFGGW-COOHNH₂-LCTMCATVFR PLLVWFWSIW-COOHNH₂-QLLLDLLLGS YEGMSLTSSP-COOHNH₂-SRSNALHTLD VLLGGT-COOH

15

NH₂-GGAVYLC DAG CCFYCCGCSG-COOHNH₂-CLELFDDLFL ALSLLLLVGG-COOHNH₂-PLCRTCLIES AVLIQLSRL-COOHNH₂-VFSGVYYAEF VFAASAGGTP-COOHNH₂-MAPVGAGRPC CTVCFLTARF-COOH

20

NH₂-LSMLLFAAKL PVAVLCSWQA-COOHNH₂-LVGRVRIGVS VFIRGGRL-COOHNH₂-LFDIFRLCAQPVLVHGHTRV-COOH

wobei das Peptid eine Modifikation in der Sequenz von bis
zu 40 % aufweisen kann.

25

2. Peptid nach Anspruch 1, wobei das Peptid als
Fusionspolypeptid vorliegt.

30

3. Peptid nach Anspruch 2, wobei das Fusionspolypeptid eine
"Leader"-Sequenz umfaßt.

4. DNA, kodierend für das Peptid nach einem der Ansprüche 1
- 3.

35

5. Expressionsvektor, enthaltend die DNA nach Anspruch 4.

6. Antikörper, gerichtet gegen das Peptid nach einem der

Ansprüche 1-9.

- 5 7. Zusammensetzung, umfassend ein oder mehrere Peptide nach einem der Ansprüche 1 - 3, ein oder mehrere Expressionsvektoren nach Anspruch 5 und/oder einen oder mehrere Antikörper nach Anspruch 6 sowie übliche Hilfsstoffe.
- 10 8. Zusammensetzung nach Anspruch 7, wobei das Peptid als Fusionspolypeptid vorliegt.
9. Zusammensetzung nach Anspruch 8, wobei das Fusionspolypeptid eine "Leader"-Sequenz umfaßt.
- 15 10. Verwendung des Peptids nach einem der Ansprüche 1 - 3, des Expressionsvektors nach Anspruch 5 oder der Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 7 - 9 zur Inhibierung eines HPV E6-Proteins.
- 20 11. Verwendung nach Anspruch 10, wobei die Inhibierung eine Eliminierung von HPV-positiven Zellen umfaßt.
12. Verwendung nach Anspruch 11, wobei die HPV-positiven Zellen von einer HPV-assoziierten Erkrankung stammen.
- 25 13. Verwendung nach einem der Ansprüche 9 - 11, wobei die Inhibierung des HPV E6-Proteins zur Behandlung von HPV-assoziierten Erkrankungen erfolgt.
- 30 14. Verwendung nach Anspruch 12 oder 13, wobei die HPV-assoziierte Erkrankung eine HPV-Infektion, eine HPV-Dysplasie und ein HPV-Karzinom umfaßt.
- 35 15. Verwendung nach einem der Ansprüche 10-14, wobei HPV HPV1, HPV5, HPV6, HPV11, HPV16, HPV18, HPV 31, HPV 33 und HPV 35 umfaßt.

1/2

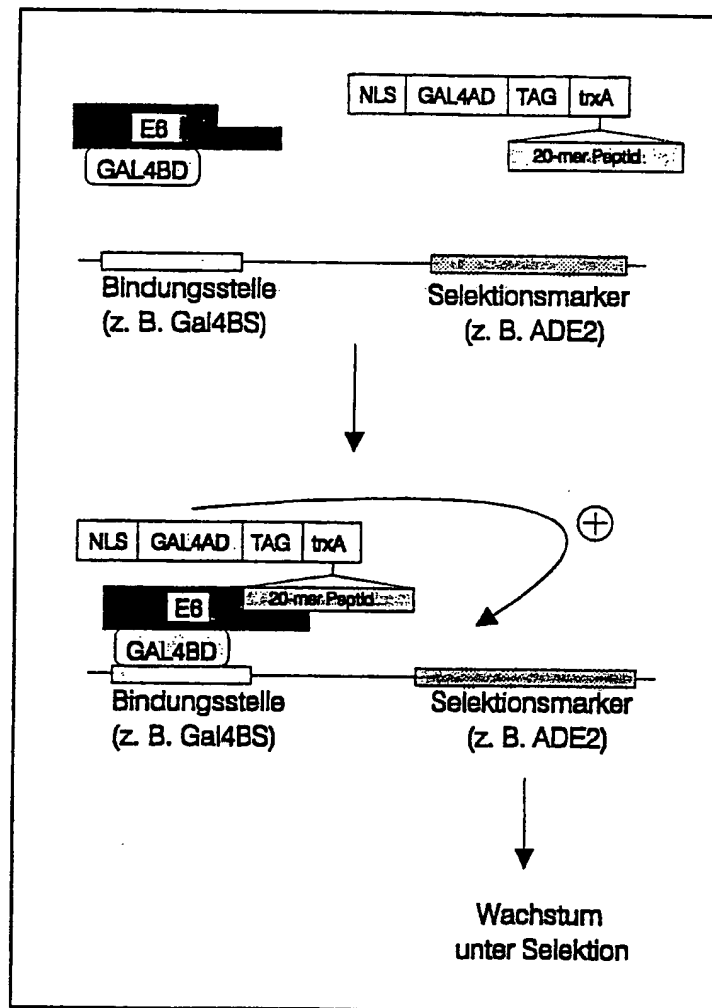


Fig. 1

2/2

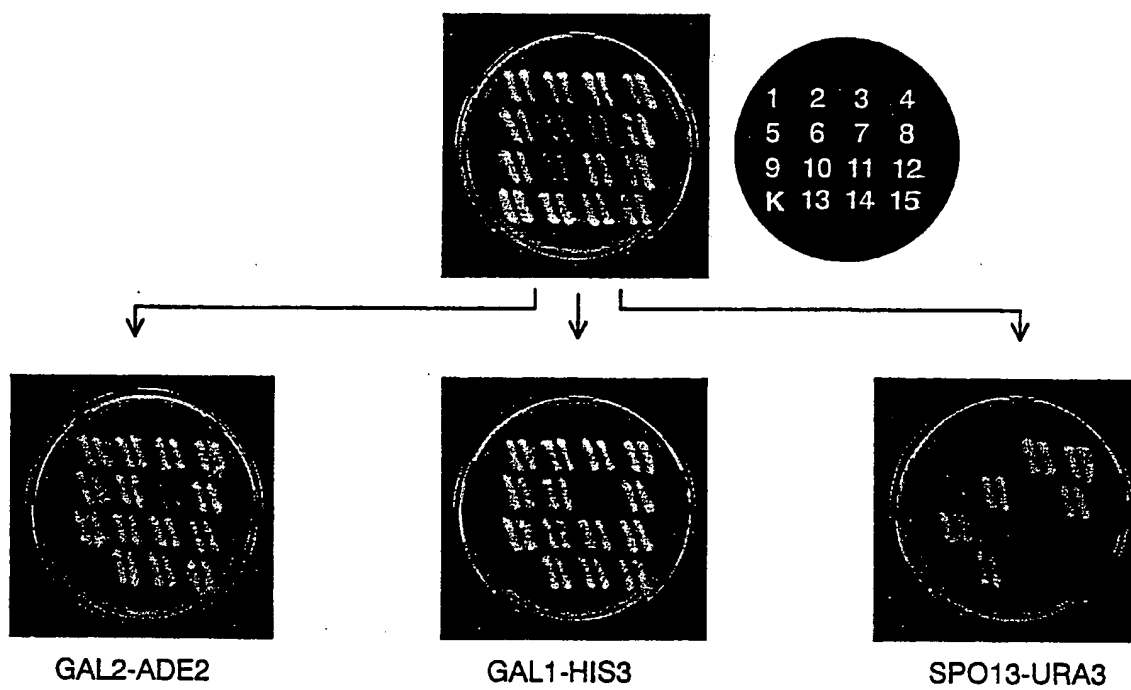


Fig. 2

SEQUENZPROTOKOLL

(1) ALLGEMEINE ANGABEN:

(i) ANMELDER:

- (A) NAME: Deutsches Krebsforschungszentrum
- (B) STRASSE: Im Neuenheimer Feld 280
- (C) ORT: Heidelberg
- (E) LAND: Deutschland
- (F) POSTLEITZAHL: 69120

(ii) BEZEICHNUNG DER ERFINDUNG: Peptide zur Inhibierung von HPV E6-Proteinen

(iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 17

(iv) COMPUTER-LESBARE FASSUNG:

- (A) DATENTRÄGER: Floppy disk
- (B) COMPUTER: IBM PC compatible
- (C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
- (D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.30 (EPA)

(v) DATEN DER JETZIGER ANMELDUNG:

ANMELDENUMMER: DE 199 01 008.0

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 1:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 20 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRANGFORM: nicht bekannt
- (D) TOPOLOGIE: nicht bekannt

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 1:

Gly	Ala	Leu	Val	His	Lys	Leu	Phe	Ser	Gln	Thr	Ser	Gly	Ser	Cys	Leu
1				5				10						15	
Val Cys Ile Ser															
20															

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 2:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 19 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRANGFORM: nicht bekannt
- (D) TOPOLOGIE: nicht bekannt

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 2:

Leu	Asp	Val	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Arg	Arg	Leu	Gly	Val	Val	Leu	Val
1				5				10						15	
Gly Leu His															

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 3:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
(A) LÄNGE: 20 Aminosäuren
(B) ART: Aminosäure
(C) STRANGFORM: nicht bekannt
(D) TOPOLOGIE: nicht bekannt

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 3:

Cys Tyr Val Glu Cys Gly Cys Glu Val Leu Thr Ala Leu Val Asn Gly
1 5 10 15
Val Arg Val Leu
20

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 4:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
(A) LÄNGE: 20 Aminosäuren
(B) ART: Aminosäure
(C) STRANGFORM: nicht bekannt
(D) TOPOLOGIE: nicht bekannt

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 4:

Gly Val Gly Gly Leu Cys Ser Cys Ala Ser Cys Val Ser Glu Asp Phe
1 5 10 15
Tyr Ala Ser Val
20

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 5:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
(A) LÄNGE: 19 Aminosäuren
(B) ART: Aminosäure
(C) STRANGFORM: nicht bekannt
(D) TOPOLOGIE: nicht bekannt

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 5:

Ile Asp Leu Leu Arg Arg Leu Ser Gln Leu His Leu Leu Leu Val Ser
1 5 10 15
Val Gly Gly

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 6:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
(A) LÄNGE: 20 Aminosäuren
(B) ART: Aminosäure
(C) STRANGFORM: nicht bekannt
(D) TOPOLOGIE: nicht bekannt

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 6:

Leu Ala Val Leu Leu Asn Gly Tyr Thr Arg Ala Ile Val Gly Ile Ser
1 5 10 15
Phe Gly Gly Trp
 20

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 7:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
(A) LÄNGE: 20 Aminosäuren
(B) ART: Aminosäure
(C) STRANGFORM: nicht bekannt
(D) TOPOLOGIE: nicht bekannt

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 7:

Leu Cys Thr Met Cys Ala Thr Val Phe Arg Pro Leu Leu Val Trp Phe
1 5 10 15
Trp Ser Ile Trp
 20

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 8:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
(A) LÄNGE: 20 Aminosäuren
(B) ART: Aminosäure
(C) STRANGFORM: nicht bekannt
(D) TOPOLOGIE: nicht bekannt

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 8:

Gln Leu Leu Leu Asp Leu Leu Leu Gly Ser Tyr Glu Gly Met Ser Leu
1 5 10 15
Thr Ser Ser Pro
 20

4

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 9:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 (A) LÄNGE: 16 Aminosäuren
 (B) ART: Aminosäure
 (C) STRANGFORM: nicht bekannt
 (D) TOPOLOGIE: nicht bekannt

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 9:

Ser Arg Ser Asn Ala Leu His Thr Leu Asp Val Leu Leu Gly Gly Thr
 1 5 10 15

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 10:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 (A) LÄNGE: 20 Aminosäuren
 (B) ART: Aminosäure
 (C) STRANGFORM: nicht bekannt
 (D) TOPOLOGIE: nicht bekannt

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 10:

Gly Gly Ala Val Tyr Leu Cys Asp Ala Gly Cys Cys Phe Tyr Cys Cys
 1 5 10 15

Gly Cys Ser Gly
 20

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 11:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 (A) LÄNGE: 20 Aminosäuren
 (B) ART: Aminosäure
 (C) STRANGFORM: nicht bekannt
 (D) TOPOLOGIE: nicht bekannt

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 11:

Cys Leu Glu Leu Phe Asp Asp Leu Phe Leu Ala Leu Ser Leu Leu
 1 5 10 15

Leu Val Gly Gly
 20

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 12:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 (A) LÄNGE: 19 Aminosäuren
 (B) ART: Aminosäure
 (C) STRANGFORM: nicht bekannt

5

(D) TOPOLOGIE: nicht bekannt

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 12:

Pro	Leu	Cys	Arg	Thr	Cys	Leu	Ile	Glu	Ser	Ala	Val	Leu	Ile	Gln	Leu
1				5					10					15	

Ser Arg Leu

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 13:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 20 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRANGFORM: nicht bekannt
- (D) TOPOLOGIE: nicht bekannt

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 13:

Val	Phe	Ser	Gly	Val	Tyr	Tyr	Ala	Glu	Phe	Val	Phe	Ala	Ala	Ser	Ala
1				5					10					15	

Gly Gly Thr Pro
20

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 14:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 20 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRANGFORM: nicht bekannt
- (D) TOPOLOGIE: nicht bekannt

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 14:

Met	Ala	Pro	Val	Gly	Ala	Gly	Arg	Pro	Cys	Cys	Thr	Val	Cys	Phe	Leu
1				5					10					15	

Thr Ala Arg Phe
20

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 15:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 20 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRANGFORM: nicht bekannt
- (D) TOPOLOGIE: nicht bekannt

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 15:

Leu Ser Met Leu Leu Phe Ala Ala Lys Leu Pro Val Ala Val Leu Cys
1 5 10 15
Ser Trp Gln Ala
20

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 16:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 19 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRANGFORM: nicht bekannt
- (D) TOPOLOGIE: nicht bekannt

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 16:

Leu Val Gly Arg Val Arg Ile Gly Val Ser Val Phe Ile Arg Gly Gly
1 5 10 15
Arg Leu Leu

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 17:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 20 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRANGFORM: nicht bekannt
- (D) TOPOLOGIE: nicht bekannt

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 17:

Leu Phe Asp Ile Phe Arg Leu Cys Ala Gln Pro Val Leu Val His Gly
1 5 10 15
His Thr Arg Val
20

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/DE 00/00141

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C07K7/02 C07K14/025 A61K38/10 C07K14/47

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 97 18309 A (NEW ENGLAND MEDICAL CENTER INC) 22 May 1997 (1997-05-22) claim 1	1
A	WO 96 02000 A (NEW ENGLAND MEDICAL CENTER INC) 25 January 1996 (1996-01-25) claim 1	1
A	US 5 532 348 A (HUIBREGTSE JON M ET AL) 2 July 1996 (1996-07-02) claim 1	1

☐ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

19 June 2000

Date of mailing of the international search report

27/06/2000

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Deffner, C-A

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

information on patent family members

Inter. Application No

PCT/DE 00/00141

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9718309 A	22-05-1997	US 5989804 A AU 7737296 A CA 2237783 A EP 0866857 A	23-11-1999 05-06-1997 22-05-1997 30-09-1998
WO 9602000 A	25-01-1996	AU 2866695 A JP 10511843 T US 5989804 A US 5821051 A	09-02-1996 17-11-1998 23-11-1999 13-10-1998
US 5532348 A	02-07-1996	US 5914389 A	22-06-1999

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE 00/00141

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 7 C07K7/02 C07K14/025 A61K38/10 C07K14/47

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 C07K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	WO 97 18309 A (NEW ENGLAND MEDICAL CENTER INC) 22. Mai 1997 (1997-05-22) Anspruch 1	1
A	WO 96 02000 A (NEW ENGLAND MEDICAL CENTER INC) 25. Januar 1996 (1996-01-25). Anspruch 1	1
A	US 5 532 348 A (HUIBREGTSE JON M ET AL) 2. Juli 1996 (1996-07-02) Anspruch 1	1

☐ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

19. Juni 2000

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

27/06/2000

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Deffner, C-A

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE 00/00141

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 9718309 A	22-05-1997	US 5989804 A	23-11-1999
		AU 7737296 A	05-06-1997
		CA 2237783 A	22-05-1997
		EP 0866857 A	30-09-1998
WO 9602000 A	25-01-1996	AU 2866695 A	09-02-1996
		JP 10511843 T	17-11-1998
		US 5989804 A	23-11-1999
		US 5821051 A	13-10-1998
US 5532348 A	02-07-1996	US 5914389 A	22-06-1999

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

☐ BLACK BORDERS

☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES

☒ FADED TEXT OR DRAWING

☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING

☐ SKEWED/SLANTED IMAGES

☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS

☐ GRAY SCALE DOCUMENTS

☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT

☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY

☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.